

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
21. Mai 2004 (21.05.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/042038 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 5/06**,  
A61K 35/32

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/003765

(22) Internationales Anmeldedatum:  
7. November 2003 (07.11.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 53 066.1 7. November 2002 (07.11.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **CO.DON AG** [DE/DE]; Warthestr. 21, 14513 Teltow  
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **JOSIMOVIC-ALA-  
SEVIC, Olivera** [DE/DE]; Schwendenerstr. 53, 14195  
Berlin (DE). **LIBERA, Jeannette** [DE/DE]; Wil-  
helm-Wolff-Str. 25a, 13156 Berlin (DE). **WIESMANN,  
Hans-Peter** [DE/DE]; Bökerhook 8, 48607 Ochtrup (DE).  
**JOOS, Ulrich** [DE/DE]; Gartenstr. 21, 48147 Münster  
(DE). **VUNJAK-NOVAKOVIC, Gordana** [US/US]; 305  
Fitzmaurice Circle, Belmont, MA 02478 (US).

(74) Anwälte: **LANGE, Sven** usw.; Patentanwälte Gulde  
Hengelhaupt Ziebig & Schneider, Schützenstrasse 15 - 17,  
10117 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,  
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,  
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ,  
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,  
TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE TREATMENT OF DISEASED, DEGENERATED, OR DAMAGED TISSUE USING THREE-  
DIMENSIONAL TISSUE PRODUCED *IN VITRO* IN COMBINATION WITH TISSUE CELLS AND/OR EXOGENIC FACTORS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BEHANDLUNG VON ERKRANKTEM, DEGENERIERTEM ODER GESCHÄDIGTEM  
GEWEBE UNTER VERWENDUNG VON *IN VITRO* HERGESTELLTEM DREIDIMENSIONALEM GEWEBE IN KOMBINA-  
TION MIT GEWEBEZELLEN UND/ODER EXOGENEN FAKTOREN

(57) Abstract: The invention relates to a tissue replacement structure, comprising (a) a pre-formed three-dimensional tissue which is  
produced from cells obtained from a human or animal organism, which are cultivated in cell culture vessels with hydrophobic surfaces  
and tapering base as a stationary suspension culture until a cell aggregate is achieved in which differentiated cells are embedded and  
which comprises an external region in which proliferation and migration cells are present, (b) (i) an autologous tissue cell suspension,  
produced from body cells with addition of body serum and without addition of growth-stimulating compounds, (ii) implants or  
support materials and/or (iii) growth factors and/or (c) the effect of electromagnetic fields, mechanical stimulation and/or ultrasound  
on the tissue from (a).

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Gewebeersatzstruktur, die (a) ein vorgeformtes dreidimensionales Gewebe  
herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Zellen gewonnen werden und diese in Zellkulturge-  
fäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden, bis ein  
Zellaggregat entsteht, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem prolifera-  
tions- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind, (b) (i) eine autologe Gewebeszellsuspension herstellbar aus körpereigenen Zellen  
unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen, (ii) Implantate oder Trägermate-  
rialien und/oder (iii) Wachstumsfaktoren und/oder (c) die Einwirkung von elektromagnetischen Feldern, mechanischer Stimulierung  
und/oder Ultraschall auf das Gewebe nach (a) umfasst.

WO 2004/042038 A1

---

Verfahren zur Behandlung von erkranktem, degeneriertem oder geschädigtem Gewebe unter Verwendung von *in vitro* hergestelltem dreidimensionalem Gewebe in Kombination mit Gewebezellen und/oder exogenen Faktoren

---

### Beschreibung

10 Die Erfindung betrifft eine neue Gewebeersatzstruktur und ein Verfahren zur Modifikation einer Gewebeläsion sowie die Verwendung von vorgeformtem dreidimensionalem Gewebe als Lieferant von Botenstoffen und/oder Strukturbausteinen.

15 Hyalines Knorpelgewebe besteht aus einem einzigen Zelltyp, den Chondrozyten, die eine elastische extrazelluläre Matrix (EZM) synthetisieren. Die gesunde EZM setzt sich hauptsächlich aus Kollagenen und Proteoglykanen (PG) zusammen. Das im hyalinen Knorpel vorherrschende Kollagen ist vom Typ  
20 II, das sehr elastische Fasern bildet. Proteoglykane sorgen für eine Quervernetzung der kollagenen Fasern. Im gesunden Knorpel findet ein ständiger Umsatz von Matrixkomponenten statt, der wichtig für die gleichbleibende Elastizität des Knorpels ist.

25

Eine wichtige Funktion für den Stoffwechsel der EZM haben Enzyme und ihre Inhibitoren. Als Enzyme im Knorpel wirksam sind Metalloproteinasen (MMPs), die einen Abbau von Kollagenen und Proteoglykanen katalysieren. Die Aktivität dieser  
30 Enzyme wird über Inhibitoren (Tissue inhibitors of Metalloproteinases: TIMPs) reguliert, die ebenfalls im Knorpel

synthetisiert werden. Ein Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs ist entscheidend für den Erhalt der Knorpelmatrix.

5 Cytokine und Wachstumsfaktoren beeinflussen die Synthese von Strukturkomponenten der Knorpelmatrix und von degradierenden Enzymen sowie deren Inhibitoren. Im gesunden Knorpel herrscht ein Gleichgewicht zwischen Abbau und Neusynthese von Matrixkomponenten und damit auch zwischen der Expression von Cytokinen und Wachstumsfaktoren, das entscheidend für den Erhalt der Elastizität des Knorpels ist  
10 und eine ständige Erneuerung der "verbrauchten" Strukturkomponenten gewährleistet. Eine verstärkte Präsenz von Wachstumsfaktoren im Gelenk kann die Regenerationsfähigkeit von Knorpel *in vivo* unterstützen.

15

Die wichtigsten für den Knorpel bekannten anabolen Wachstumsfaktoren stellen Transforming-Growth-Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF), Fibroblast-Growth-Factor 2 (FGF2; früher basic (b) FGF), Insulin-Like-Growth-Factor (IGF) und die Bone-Morphogenetic-Proteins (BMPs)  
20 dar. TGF $\beta$ , IGF I und BMP-2 werden als wichtigste Faktoren für eine Förderung der Knorpelreifung angesehen.

Sowohl PDGF, als auch IGF stimulieren das Wachstum von humanen Chondrozyten. IGF I ist der dominante Wachstumsfaktor  
25 im adulten Gewebe und fördert die PG-Synthese und hemmt den Abbau von Knorpelmatrix, selbst nach einer Stimulation mit dem Knorpel-degradierenden Cytokin IL-1 $\beta$ .

30 TGF $\beta_1$  hat im Knorpelstoffwechsel eine anabole Wirkung, da er die Expression von TIMP, die PG- und Kollagen-Synthese stimuliert und das Wachstum von Chondrozyten fördert. Zusätzlich verstärkt TGF $\beta_1$  die Knorpel-regenerierende Wirkung

von PDGF und IGF.

FGF 2 stimuliert die Proliferation von kultivierten Chondrozyten und hat in Kombination mit TGF $\beta$  eine synergistische Wirkung, eine Stimulierung der Matrixsynthese durch FGF ist ebenfalls nachzuweisen.

BMPs regen die Proteoglykansynthese in Chondrozyten an und unterstützen die Differenzierung von Vorläuferzellen (zum Beispiel aus dem Periost oder Knochenmark) zu reifen Chondrozyten. Insgesamt treiben sie die Differenzierung von Chondrozyten voran und unterstützen damit die Knorpelheilung.

Der Wirkmechanismus der von Brittberg und Peterson entwickelten klassischen ACT-Technik beruht auf der Fähigkeit autologer, in Monolayer vermehrter Chondrozyten *in vivo* ein hyalines bzw. hyalinähnliches Regenerat zu bilden, das dem umgebenden hyalinen Gelenknorpel gleicht und damit eine funktionelle Regeneration von Knorpel-Läsionen darstellt.

Zur Behandlung der Patienten ist es notwendig, eine geringe Anzahl an Chondrozyten, die aus einer kleinen Biopsie gewonnen werden, in Monolayer-Kultur zu vermehren. Dabei nehmen die Chondrozyten die typische Form mesenchymaler Zellen an und ändern im Vergleich zur *in situ*-Situation ihr Expressionsmuster. Die Fähigkeit von Chondrozyten, nach einer Vermehrung in Monolayer und anschließender Überführung in 3D-Kultur erneut die Marker hyalinen Knorpels zu exprimieren, wurde jedoch *in vitro* bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen. An einem speziell entwickelten Zellkultur-System konnte auch gezeigt werden, dass rein autolog in Monolayer vermehrte Chondrozyten - ohne den Zusatz von

Periost oder Wachstumsfaktoren - nach einer Überführung in eine 3D-Kultur ohne Träger Kollagen II und S-100 als Knorpelmarker reexprimieren. Die Injektion von Wachstums-faktoren fördert und verstärkt in verschiedenen Zellkultur-systemen die Synthese von spezifischen Knorpelmarkern und beschleunigt eine Heilung von Knorpeldefekten in Tiermodellen. Daher kann man davon ausgehen, dass *in vivo* nach der Durchführung einer ACT die selben Mechanismen wirksam werden. Nach Applikation in den durch Periost oder Kollagenmaterial geschaffenen dreidimensionalen Raum im Gelenk zeigen die Chondrozyten wieder ihr *in vivo* Expressionsmuster und regenerieren hyalinen Knorpel mit einer deutlichen Expression von Kollagen Typ II. Dies wurde anhand von Biopsien, die Patienten nach Durchführung einer ACT entnommen wurden, bestätigt. *In vitro* konnte bereits nachgewiesen werden, dass durch kultiviertes Periost Wachstumsfaktoren wie TGF $\beta$ , IGF I und BMP-2 sekretiert werden und somit die Regeneration des hyalinen Knorpels durch die im Rahmen der ACT injizierten Chondrozyten fördern können.

In weiteren *in vitro* Experimenten mit Gelenkknorpel verschiedener Spezies wurde gezeigt, dass sich Chondrozyten, die in einer Zellsuspension auf die Knorpeloberfläche aufgebracht werden, stabil mit dem nativen Gewebe verbinden. So kommt es zu einer stabilen und langfristigen Integration des nach ACT neugebildeten Knorpels in den nativen Umgebungsknorpel.

Beim normalen Gebrauch der Gelenke ist der sie überziehende hyaline Gelenkknorpel enorm hohen Druckbelastungen ausgesetzt und Schädigungen seiner Struktur oder Verletzungen haben große Auswirkungen auf die gesamte Funktionalität des Systems.

Die natürliche Regenerationskapazität des Gelenkknorpels ist sehr gering. Im gesunden erwachsenen Knorpel teilen sich die Chondrozyten normalerweise nicht mehr (Mankin 64). Lediglich Gelenkknorpeldefekte, bei denen die subchondrale Knochenplatte beschädigt wird, besitzen aufgrund des Einwanderns von Stammzellen aus dem Markraum eine gewisse Kapazität zur Reparatur. Dagegen haben oberflächliche chondrale Defekte mit intakter subchondraler Knochenplatte praktisch keine Kapazität zur Selbstregeneration.

10

Ist der Knorpel einmal geschädigt, weitert sich die Degeneration aufgrund einer Stimulierung von knorpeldegradierenden Einflüssen kontinuierlich aus. Daher besteht nach einer Verletzung des Knorpels für die betroffenen Patienten ein deutlich erhöhtes Arthroserisiko, was letztendlich häufig den Einsatz einer Gelenkendoprothese nötig macht.

Auf dem Gebiet der regenerativen Medizin werden gemäß dem oben Ausgeführten seit längerem Lösungen zur Wiederherstellung der Funktion von Geweben bzw. zum Aufbau von Geweben gesucht, die geschädigt, degeneriert oder krank sind bzw. waren. Bisher werden hierzu zum einen körpereigene Zellen mit und ohne Trägermaterial verwendet und zum anderen ausschließlich Trägermaterialien, wobei je nach Indikation resorbierbare oder nicht resorbierbare Materialien eingesetzt werden können.

Aufgabe der Erfindung war es daher, eine Gewebeersatzstruktur bzw. ein *in vitro* Gewebe, insbesondere eine Knorpelersatz- oder eine Knorpelregenerationsstruktur, und ein Verfahren zur Behandlung bzw. Modifikation von erkranktem, beschädigtem und degeneriertem Gewebe bereitzustellen, das eine einfache, sichere, effiziente und wirksame Behandlung von Gewebedefekten, wie zum Beispiel erkranktem, beschädig-

tem und degeneriertem Knorpelgewebe, ermöglicht.

Die Erfindung löst dieses technische Problem durch die Bereitstellung einer Gewebeersatzstruktur, die

- 5 (a) ein vorgeformtes dreidimensionales Gewebe herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Zellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden, bis ein Zellaggregat entsteht, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind,
- 10
- 15 (b) (i) eine autologe Gewebezellsuspension herstellbar aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen, (ii) Implantate oder Trägermaterialien und/oder (iii) Wachstumsfaktoren
- 20 und/oder
- (c) die Einwirkung von elektromagnetischen Feldern, mechanischer Stimulierung und/oder Ultraschall auf (a)

umfasst.

25

Die Erfindung betrifft demgemäß ein dreidimensionales Gewebe, das heißt *in vitro* Gewebe, für die Effektivierung der Gewebetherapie - die auch als Sphäroide bezeichnet werden können - von unterschiedlicher Größe. Diese Gewebeersatz- oder Geweberegenerationsstrukturen bzw. Sphäroide sind im Wesentlichen zusammengesetzt aus der durch die im Sphäroid enthaltenen Zellen und der durch diese Zellen gebildeten Matrix, die in Kombinationen mit Einzelsuspensionszellen,

30

mit genetisch modifizierten Einzelsuspensionszellen, mit Trägermaterialien, mit exogenen Wachstumsfaktoren, Wirkstoffen, exogener DNA, RNA und/oder mit Implantaten vorliegen. Derartige Sphäroide können zur Behandlung bei erkranktem, degeneriertem und/oder geschädigtem Gewebe als *in vitro* Testsysteme für biologische und chemische Wirkstoffe und physikalische Faktoren sowie als Organersatz bzw. als Gewebeersatzstrukturen eingesetzt werden. Die erfindungsgemäßen Gewebeersatzstrukturen dienen dazu, die Geweberegeneration zu induzieren und zu beschleunigen oder diese erst zu ermöglichen, beispielsweise wenn Sphäroide in Kombination mit spezifischen Wirkstoffen verwendet werden, wie zum Beispiel beim Herzmuskelaufbau nach einem Herzinfarkt.

Während im Stand der Technik körpereigene Zellen mit und ohne Trägermaterial oder nur resorbierbare bzw. nicht resorbierbare Trägermaterialien verwendet werden, werden mit den erfindungsgemäßen Strukturen *in vitro* hergestellte, strukturell und funktionell vorgefertigte dreidimensionale Gewebe zur Herstellung von Organ- und Gewebefunktionen verwendet und transplantiert, das heißt, es kommen keine Einzelzellen gemäß den bekannten Verfahren und Strukturen zum Einsatz. Die erfindungsgemäßen Gewebeersatzstrukturen bzw. Sphäroide ermöglichen daher zum einen die Transplantation von vorgefertigtem Gewebe und eine weitere Effektivierung durch die Kombination von unterschiedlichsten Gewebesphäroiden mit Einzelzellen und exogenen Faktoren. So werden beispielsweise Wachstumsfaktoren anders als im Stand der Technik nicht mehr durch Träger oder Trägermaterialien - ob in Kombination mit Zellen oder ohne diese - freigesetzt. Überraschend konnte gezeigt werden, dass die neuen Gewebeersatzstrukturen oder Sphäroide zum Kombinieren mit anderen geweberegenerationsfördernden Faktoren eingesetzt werden können. Insbesondere bei der Verwendung von erfindungsgemäßen Knorpelsphäroiden und Knorpelzellen konnte



eine verbesserte Genese erreicht wurde. Diese überraschende verbesserte Genese konnte auch bei der Kombination von anderen Sphäroiden und wachstumsfördernden Faktoren bzw. Zellen beobachtet werden.

5

Bei vielen Erkrankungen können Gewebeersatzstrukturen oder Sphäroide nicht isoliert in die erkrankte Geweberegion eingesetzt werden, da sie aufgrund der Gegebenheiten nach der Transplantation nicht an einem Ort verbleiben und somit  
10 keine gezielte Geweberegeneration einleiten können. Vorteilhafterweise können die Sphäroide an den jeweiligen Orten fixiert werden. Dies geschieht mit Vorteil durch die Kombination mit einem Träger oder einer Membran, die selbst im Defektbereich bzw. in dessen Umgebung verankert bzw.  
15 immobilisiert werden kann. Künstliche dreidimensionale Gewebebildungen, wie zum Beispiel die so genannten Zellkugeln aus Knochenzellen, besitzen noch nicht so eine hohe mechanische Festigkeit, als dass man diese allein in einen Knochendefekt einbringen kann. Die erfindungsgemäßen Gewebeersatzstrukturen bzw. Sphäroide werden in Kombination mit  
20 einem dreidimensionalen Träger eingebracht. Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass Sphäroide besonders gut mit dem Trägermaterial wechselwirken, adhärieren und sich integrieren. Dies ermöglicht mit Vorteil eine gute Fixierung der Sphäroide im Defektbereich. Die Adhäsion der  
25 Sphäroide wird überraschenderweise durch die Anwesenheit von Einzelzellen gefördert, wobei die Einzelzellen eine Kontaktbrücke zwischen dem nativen zu behandelnden Gewebe und den Sphäroiden bzw. Gewebeersatzstrukturen herstellen.  
30 Dies konnte insbesondere bei der Verwendung von Knorpelaggregaten mit Knorpelzellen an und im nativen Knorpelgewebe gezeigt werden. Die Einzelzellen bzw. die körpereigenen Zellen können erfindungsgemäß gentechnisch modifiziert sein, um zum Beispiel den Geweberegenerationsprozess  
35 zu fördern. Insbesondere wenn Sphäroide nicht gentechnisch

transfiziert werden können, kann die Wirkung der Geweberegenerationsförderung durch Gabe von gentechnisch veränderten Zellen im Defektbereich erreicht werden.

5 Der regenerative Prozess durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Gewebeersatzstrukturen kann bevorzugt auch nach einer Transplantation des Sphäroides in das zu behandelnde Gewebe durch eine Kombination des Sphäroides mit Wachstumsfaktoren oder anderen Faktoren verwendet werden,  
10 wenn beispielsweise gentechnische Modifikationen nicht gewünscht sind. Als Faktoren können beispielsweise DNA- oder RNA-Moleküle eingesetzt werden, die zum Beispiel nach unspezifischer Aufnahme durch die Zellen ebenfalls zu einer Synthese der entsprechenden Sequenzen führen können.

15 Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Strukturen ist, dass sie auch als Testsystem für Medikamente verwendet werden können. Dies gilt insbesondere auch dann, wenn die Sphäroide aus erkrankten Zellen, zum Beispiel aus arthrotischen Knorpelzellen, gewonnen werden oder aus Tumorzellen oder aus Muskelzellen bei Muskelschwund, an denen Wirkstoffe und Medikamente untersucht werden. Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Gewebeersatzstrukturen ist neben der schnellen Wirksamkeit und ihrer Verwendung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Tatsache, dass Patienten, die Menschen oder Tiere sein können, rein autolog behandelt werden können und somit das Risiko einer Abwehrreaktion auf das eingebrachte Transplantat ausgeschlossen werden kann. Insbesondere werden hierdurch die Krankenhaus- und Reha-  
20 bilitationszeiten signifikant vermindert. Ebenfalls vermindert werden die Kosten des gesamten Regenerationsverfahrens und es wird eine schnellere Wiederherstellung der behandelten Patienten erreicht. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Strukturen zum Screening von Wirkstoffen  
25 oder allgemein als *in vivo*- oder *in vitro*-Testsystem  
35

verwendet werden, z. B. um Arzneimittel auf ihren Einfluss auf die Geweberegeneration zu testen.

Als Zellen in dem Gewebe können bevorzugt verwendet werden:

5 Muskelzellen (quergestreifte (Herzmuskel und Skelettmuskeln und glatte Muskelzellen), Knorpelzellen (aus hyalinem Knorpel, aus Faserknorpel, aus elastischem Knorpel), Knochenzellen (Osteoblasten und Osteozyten), Hautzellen (Keratinocyten (zum Beispiel Stachelzellen), Bindegewebs-

10 zellen aus dem Corium und der Subcutis, Zellen aus ekkrinen und apokrinen Schweißdrüsen sowie Talgdrüsen, Zellen der Haaranlage (zum Beispiel mitotisch aktive Haarzwiebelzellen, Zellen aus der Nagelanlage), Endothelzellen, Bindegewebszellen (Fibroblasten, Fibrozyten, Wanderzellen, Mast-

15 zellen, Pigmentzellen, Retikulumzellen), Fettzellen (adulte Fettzellen und Fettvorläuferzellen), Nervengewebszellen (Nervenzellen, Neurogliazellen), mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark/peripheren Blut, Leberzellen, Epithelzellen aus einschichtigen und mehrschichtigen Epithelien

20 und Oberflächenepithelien, Gangepithelien, Drüsenepithelien, Sinnesepithelien, Endoepithelien (Zellen aus dem Stratum superficiale, stratum intermedium, Stratum basale, Stratum vorneum, Stratum granulosum, Stratum spinosum) und/oder Bauchspeicheldrüsenzellen.

25

Die Zellen zur Kombination mit dem Gewebe können dabei bevorzugt eingesetzt werden: Muskelzellen (quergestreifte (Herzmuskel und Skelettmuskeln und glatte Muskelzellen), Knorpelzellen (aus hyalinem Knorpel, aus Faserknorpel aus

30 elastischem Knorpel), Knochenzellen (Osteoblasten und Osteozyten), Hautzellen (zum Beispiel Keratinocyten), Endothelzellen, Bindegewebszellen (Sehnen und Bänder), Fettzellen (adulte Fettzellen und Fettvorläuferzellen), Nervengewebszellen (Nervenzellen, Neurogliazellen), Stamm-

35 zellen (aus dem Knochenmark/peripheren Blut, aus adulten

Gewebe an sich (zum Beispiel Pankreas, Cornea), von Embryonen und Föten), Leberzellen, Epithelzellen aus einschichtigen und mehrschichtigen Epithelien und Oberflächenepithelien, Gangepithelien, Drüsenepithelien, Sinnesepithelien, Endoepithelien (Zellen aus dem Stratum superficiale, stratum intermedium, Stratum basale, Stratum vorneum, Stratum granulosum, Stratum spinosum) und/oder Bauchspeicheldrüsenzellen. Die Zellen in dem Gewebe, das heißt dem vorgeformten dreidimensionalen Gewebe, und die einzelnen Zellen aus der Gewebezellsuspension können genetisch modifiziert sein. Die genetische Modifizierung kann dergestalt erfolgen, dass insbesondere Wachstumsfaktoren, Cytokine, Strukturproteine, Markierungsproteine oder regulatorische Wirkstoffe exprimiert werden.

Vorteilhafterweise können die erfindungsgemäßen Strukturen mit Implantaten oder Trägermaterialien kombiniert werden, zum Beispiel:

- Biokompartible, abbaubare oder nicht abbaubare (resorbierbare), allogene, autologe, xenogene und synthetische Materialien, die selber noch exogene Faktoren (wie Wachstumsfaktoren) tragen können,
- Polymere (zum Beispiel Polylactide, Polyglykolide, Hyaluronsäuren und all deren Derivate,
- vorzugsweise ein neutrales PGA/PLA-Gemisch,
- Kalziumkarbonate, Hydroxyapatite, Kalziumphosphate, tierische natürliche vorbehandelte Knochenmatrix,
- Faserproteine, Fibrin-basierte Träger,
- Gele (wie Aliginate, Agarose, Kollagengel, Hydrogele, Fibrin),
- Membranen, Fleeze, Skaffolds (3D Träger) und/oder

- Prothesen (Titan, diverse metallische und edelmetallische Werkstoffe)..

Weiterhin ist es möglich, die erfindungsgemäßen Strukturen, aber auch die Gewebezellsuspension oder das vorgeformte  
5 dreidimensionale Gewebe mit exogenen Wachstumsfaktoren zu kombinieren. Es können hierbei die jeweils gewebespezifischen Wachstumsfaktoren eingesetzt werden, die an dem jeweiligen Ort die Prozesse des Gewebeaufbaus und -umbaus bewirken oder für diese verantwortlich sind bzw. diese regulieren.  
10 Bei Knorpel ist dies zum Beispiel einer der folgenden Faktoren: Transforming-Growth-Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF), Fibroblast-Growth-Factor 2 (FGF2; früher basic (b) FGF), Insulin-Like-Growth-Factor (IGF) und die Bone-Morphogenetic-Proteins (BMPs); und für  
15 den Knochen beispielsweise BMP7 oder für den Muskel beispielsweise MGF.

Selbstverständlich können neben den exogenen Wachstumsfaktoren auch andere exogene Faktoren eingesetzt werden,  
20 die sämtliche regulatorisch wirksame Stoffe, wie zum Beispiel Cytokine oder Enzyme, aber auch RNA- und DNA-Moleküle oder aber Viren oder üblicherweise von Körperzellen hergestellte oder sezernierte Proteine wie zum Beispiel: Cytokine (IL-1, TNF-alpha), Adhäsionsproteine, Enzyme (Lipasen, Proteinasen),  
25 Botenstoffe (cAMP), Matrixstrukturproteine (Kollagene, Proteoglykane), Proteine allgemein, Lipide (Phosphatidylserin).

Weiterhin betrifft die Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform die Bereitstellung einer Knorpelersatzstruktur, wobei diese  
30

- (a) ein vorgeformtes dreidimensionales Knorpelgewebe herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Knorpelzellen, Knochenzellen,

oder mesenchymale Stammzellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden, bis ein Zell-  
5 aggregat entsteht, das zu mindestens 40 Vol.% extrazelluläre Matrix beinhaltet, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind,

10 und

(b) eine autologe Knorpelzellsuspension hergestellt aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Verwendung von wachstumsfördernden Verbindungen und/oder die Einwirkung von  
15 physikalischen Faktoren auf das Gewebe nach (a)

umfasst.

Erfindungsgemäß werden als Ausgangsmaterial für das vorgeformte Gewebe - das heißt für einen Bestandteil der  
20 Gewebeersatzstruktur - patienteneigene Gewebebiopsien oder -proben oder mesenchymale Stammzellen, zum Beispiel aus dem peripheren Blut oder Knochenmark, verwendet. Aus den Biopsien werden die gewebeaufbauenden Zellen mittels enzymatischem Verdau des Gewebes, durch Auswandern oder  
25 durch Reagenzien, die Zielzellen erkennen, mit üblichen Methoden isoliert. Diese Zellen werden dann erfindungsgemäß in einfacher Weise mit üblichem Kulturmedium in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden in Suspension so lange stationär  
30 kultiviert, bis ein dreidimensionales Zellaggregat entsteht, das zu mindestens 40 Vol.%, vorzugsweise mindestens 60 Vol.% bis maximal 95 Vol.%, extrazelluläre Matrix (ECM) beinhaltet, in welche differenzierte Zellen

eingebettet sind. Das entstandene Zellaggregat weist einen äußeren Bereich auf, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind.

5 Es ist erstaunlich, dass alle Zellen, die in den nach dieser Erfindung hergestellten Sphäroiden integriert sind, überleben und auch nach fortschreitender Kultivierungsdauer die Zellen im Inneren nicht absterben. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer differenzieren die Zellen im Inneren der  
10 Aggregate aus und es bilden sich Sphäroide, die aus ECM, differenzierten Zellen und einer Proliferationszone am Rand bestehen. Der Prozess der Bildung dieser gewebespezifischen Matrix mit eingebetteten Zellen ist dem Prozess der Gewebsentstehung bzw. -neubildung und -umbildung im Körper sehr  
15 ähnlich. Während der Differenzierung in Zellkultur wird der Abstand der aggregierten Zellen durch Bildung der gewebespezifischen Matrix immer größer. Es entsteht im Inneren der Sphäroide eine Gewebehistologie, die dem natürlichen Gewebe sehr ähnlich ist. Die Versorgung der Zellen im In-  
20 neren der Sphäroide erfolgt, wie im natürlichen Knorpel auch, allein durch die Diffusion der Nährstoffe. Während der weiteren Herstellung der Sphäroide bildet sich die Zone proliferationsfähiger und migrationsfähiger Zellen am Rand der Sphäroide. Diese Zone hat den unschätzbaren Vorteil,  
25 dass nach Einbringen der Sphäroide in Defekte, die in dieser Randzone befindlichen Zellen in der Lage sind, auszuwandern und aktiv den Kontakt zum umliegenden Gewebe herzustellen bzw. eine Integration des *in vitro* gebildeten Gewebes in seine Umgebung ermöglichen. Damit sind die her-  
30 gestellten gewebespezifischen Zellaggregate hervorragend zur Behandlung von Gewebsdefekten und zum Neuaufbau von Gewebe *in vitro* und *in vivo* geeignet.

In Abhängigkeit von der Größe des zu behandelnden Gewebe-  
35 defektes kann es von Vorteil sein, bereits größere Gewebe-

stücke zu transplantieren, um ein schnelleres Auffüllen des Defektes zu erreichen. Für diesen Fall werden mindestens zwei, besser aber mehr der erhaltenen Zellaggregate fusioniert, indem sie gemeinsam unter den gleichen Bedingungen und in den gleichen Kulturgefäßen - wie oben beschrieben - bis zur gewünschten Größe weiterkultiviert werden.

Das erhaltene Knorpel- oder Knochengewebe ist außerordentlich stabil. Die Zellaggregate können auf  $\frac{3}{4}$  ihres Durchmessers komprimiert werden, ohne dass sie zerbrechen oder beispielsweise beim Injizieren in den Körper mittels einer Kanüle auseinanderfallen. Es ist möglich, diese Gewebestückchen mit einer Pinzette oder einer Pipette aus dem Zellkulturgefäß zu entnehmen.

Um ausreichend Knorpel- oder Knochenzellen für die erfindungsgemäße Suspensionskultivierung zur Verfügung zu haben, werden die vom Patienten gewonnenen Zellen in einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung zunächst in an sich bekannter Art und Weise in Monolayerkultur vermehrt. Die Passage der Zellen in Monolayerkultur wird so gering wie möglich gehalten. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums werden die in Monolayer gewachsenen Zellen geerntet und gemäß des erfindungsgemäßen Verfahrens in Suspension, wie oben beschrieben, kultiviert.

Als Zellkulturmedium kann sowohl ein für die Suspensions- als auch für die Monolayerkultur übliches Medium, zum Beispiel Dulbecco's MEM, unter Zusatz von Serum, verwendet werden. Vorzugsweise wird DMEM und Hams im Verhältnis 1 : 1 eingesetzt. Um jedoch immunologische Reaktionen des Patienten auf das *in vitro* hergestellte Gewebe zu vermeiden, wird als Serum vorzugsweise autogenes Serum des Patienten eingesetzt. Es ist auch möglich, xenogenes oder allogenes Serum zu verwenden.



Dem Kulturmedium werden erfindungsgemäß keine Antibiotika, Fungistatika oder andere Hilfsstoffe zugesetzt. Es hat sich gezeigt, dass nur die autogene, xenogene oder allogene Kultivierung der Zellen und Zellaggregate sowie die Kultivierung ohne Antibiotika und Fungistatika eine unbeeinflusste Morphologie sowie Differenzierung der Zellen in der Monolayerkultur und eine ungestörte Bildung der spezifischen Matrix in den Zellaggregaten ermöglicht. Weiterhin sind durch den Verzicht sämtlicher Zusatzstoffe während der Herstellung nach Einbringen des *in vitro* hergestellten Gewebes in den menschlichen und auch tierischen Organismus sämtliche immunologische Reaktionen ausgeschlossen.

Es ist allerdings überraschend, dass weder bei der Suspensionskultivierung, noch bei der Monolayerkultivierung Wachstumsfaktoren oder andere wachstumsfördernde Zusätze notwendig sind. Trotz des Fehlens dieser Zusätze werden bereits nach zweitägiger erfindungsgemäßer Suspensionskultivierung dreidimensionale Zellaggregate mit gewebespezifischen Eigenschaften erhalten. Die Größe hängt natürlich von der eingebrachten Zellzahl pro Volumen Kulturmedium ab. Werden beispielsweise  $1 \times 10^7$  Zellen in 300  $\mu\text{l}$  Kulturmedium eingebracht, so entstehen innerhalb von 1 Woche dreidimensionale Sphäroide von ca. 500-700  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Für einen  $1 \text{ cm}^2$ -Gewebedefekt müssten zirka 100 solcher Sphäroide transplantiert, zum Beispiel injiziert, werden. Die andere Möglichkeit ist die *in vitro*-Fusion der kleinen Zellaggregate zu größeren - wie oben beschrieben - und das Einbringen dieser in den Defekt. Vorzugsweise werden erfindungsgemäß zwischen  $1 \times 10^4$  und  $1 \times 10^7$  Zellen in 300  $\mu\text{l}$  Kulturmedium zur Herstellung der kleinen Zellaggregate verwendet, besonders bevorzugt  $1 \times 10^5$  Zellen. Die nach einigen Tagen gebildeten Sphäroide werden dann für mindestens 2 bis 4 Wochen in Abhängigkeit von der Zellart und

den patientenspezifischen Charakteristika in dem geeigneten Kulturmedium kultiviert, um die Ausbildung der gewebespezifischen Matrix zu induzieren. Im besonderen Falle können dann einzelne Sphäroide ab zirka einer Woche Kultivierung fusioniert werden, um die Größe des Gewebestückes zu erhöhen.

Als Zellkulturgefäße müssen für die erfindungsgemäße Kultivierung in Suspension solche mit hydrophober, also adhäsionsverhindernder Oberfläche, wie zum Beispiel Polystyrol oder Teflon, eingesetzt werden. Zellkulturgefäße mit nichthydrophober Oberfläche können durch Beschichten mit Agar oder Agarose hydrophobiert werden. Weitere Zusätze sind nicht erforderlich. Vorzugsweise dienen als Zellkulturgefäße Napfplatten. Dabei können für die Herstellung der kleinen Zellaggregate beispielsweise 96-Napfplatten und für die Herstellung der fusionierten Aggregate 24-Napfplatten Verwendung finden.

Erfindungsgemäß müssen die Zellkulturgefäße einen sich verjüngenden, vorzugsweise gewölbten Boden aufweisen. Es hat sich gezeigt, dass sich das erfindungsgemäße Gewebe in Gefäßen mit flachem Boden nicht bildet. Offensichtlich dient die Vertiefung zum Finden der Zellen. Das so gewonnene vorgeformte dreidimensionale Gewebe bildet in Kombination mit der Gewebezellsuspension, bevorzugt der Knorpelzellsuspension, die Gewebe-, bevorzugt Knorpelersatzstruktur. Es ist jedoch ebenfalls bevorzugt, das vorgeformte dreidimensionale Gewebe kombiniert mit Trägermaterialien oder Wachstumsfaktoren zu verwenden. Weiterhin ist es bevorzugt, auf das vorgeformte Gewebe physikalische Kräfte wie elektromagnetische Felder, mechanische Stimulierung und/oder Ultraschall wirken zu lassen. Diese physikalischen Kräfte können während der Herstellung der Ersatzstruktur in

*vitro* - zum Beispiel im Kulturgefäß - oder *in vivo* - im Patienten - auf das vorgeformte Gewebe einwirken.

Bevorzugt ist, dass die Gewebeersatzstruktur eine Muskelersatzstruktur, insbesondere eine glatte Herzmuskelerersatzstruktur oder eine Knochenersatzstruktur ist.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Modifikation einer Gewebeläsion, bei dem in die Gewebeläsion

10 (a) eine autologe Zellsuspension hergestellt aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen

und

(b) ein vorgeformtes dreidimensionales Gewebe herstellbar  
15 dadurch, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Zellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden, bis ein Zellaggregat  
20 entsteht, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind

eingebracht werden

25 und/oder

(c) mit elektromagnetischen Feldern, mechanischer Stimulierung und/oder Ultraschall auf das Gewebe nach  
(a) *in vivo* oder *in vitro* eingewirkt wird,

30 eingebracht werden.

Die Erfindung betrifft in einer weiteren bevorzugten Aus-

föhrungsform ein Verfahren zur Modifikation einer Knorpelläsion, bei dem in die Knorpelläsion

(a) eine autologe Knorpelzellsuspension hergestellt aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen

und

(b) ein vorgeformtes dreidimensionales Knorpelgewebe herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Knorpelzellen, Knochenzellen, oder mesenchymale Stammzellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden bis ein Zellaggregat entsteht, das zu mindestens 40 Vol.% extrazelluläre Matrix beinhaltet, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind,

einggebracht werden und/oder mit physikalischen Faktoren auf das Gewebe nach (a) *in vitro* oder *in vivo* eingewirkt wird.

Bevorzugt ist die Gewebeläsion eine Knochen-, Knorpel- und/oder Muskelläsion.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird die natürliche Wirkung von Wachstumsfaktoren, die eine Regeneration von Knorpel unterstützen, genutzt, um die Behandlung des Defektes, insbesondere gegenüber der klassischen Therapie zu beschleunigen. Mit Hilfe des dreidimensionalen Gewebes, insbesondere Knorpelgewebes, ist es möglich, eine Expression von völlig natürlichen autologen Wachstumsfaktoren direkt im behandelten Defekt zu erreichen und damit die Bildung eines funktionsfähigen Regenerates zu beschleunigen.

Im Rahmen einer Behandlung der Modifikation einer Gewebeläsion, insbesondere einer Knorpelläsion, werden demgemäß neben einer autologen Knorpelzellsuspension auch ein vorgeformtes dreidimensionales Knorpelgewebe appliziert, wobei das dreidimensionale Knorpelgewebe die für die Stimulation der Matrixsynthese notwendigen Wachstumsfaktoren synthetisiert, wodurch die Heilung bzw. Modifikation des behandelten Gewebes Schadens, wie zum Beispiel des Knorpelschadens, unterstützt wird. Die gemeinsam mit dem dreidimensionalen Knorpelgewebe, welche auch als 3D Konstrukte bezeichnet werden können, eingebrachten Zellen der Knorpelsuspension garantieren, dass eine optimale Integration des entstehenden Regenerates, insbesondere in den Umgebungsknorpel erfolgt. Durch die von dem dreidimensionalen Gewebe synthetisierten Wachstumsfaktoren wird zum Beispiel die Matrixbildung der Suspensionszellen verstärkt angeregt und damit die Heilung des Defektes beschleunigt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere deshalb vorteilhaft, da unter völlig autologen Bedingungen, das heißt ohne den Zusatz von Stoffen, die nicht vom Patienten selbst stammen, bereits *in vitro* ein dreidimensionales Knorpelgewebe vorgeformt wurde, das in seinen Eigenschaften nativem Knorpel sehr ähnlich ist und damit sofort nach der Operation die Grundlage für den weiteren Aufbau von Knorpelsubstanz schafft.

Ein weiterer Vorteil ist, dass die aufwendige Applikation des Periostlappens gemäß den bekannten Verfahren damit umgangen werden kann, da die durch das Periost sezernierten Wachstumsfaktoren, die in dem bekannten Verfahren essentiell für den Wirkmechanismus sind, in dem erfindungsgemäßen Verfahren durch das vorgeformte dreidimensionale

Knorpelgewebe bereitgestellt werden. Es konnte erfindungs-  
gemäß nachgewiesen werden, dass die vorgeformten dreidimen-  
sionalen Knorpelgewebe in der Lage sind, bereits *in vitro*  
eine hyaline Knorpelmatrix zu bilden. Insbesondere Kollagen  
5 II, als das charakteristische Protein hyalinen Gelenk-  
knorpels, wird durch die vorgeformten dreidimensionalen  
Knorpelgewebe in großen Mengen gebildet und vor allem  
werden die Wachstumsfaktoren zu diesem Zeitpunkt der Trans-  
plantation bereits aktiv hergestellt:

10

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird nach  
dem Einbringen der Knorpelzellsuspension und des Knorpel-  
gewebes die Läsion mit einer Membran abgedeckt.

15 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von aus einem  
menschlichen oder tierischen Organismus gewonnenen Knorpel-  
zellen, Muskelzellen, Knochenzellen, oder mesenchymale  
Stammzellen, die in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Ober-  
fläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur  
20 stationär so lange kultiviert werden, bis ein Zellaggregat  
entsteht, das insbesondere zu mindestens 40 Vol.% extrazel-  
luläre Matrix beinhaltet, in welche differenzierte Zellen  
eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist,  
in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vor-  
25 handen sind, als Lieferant von Botenstoffen, Struktur-,  
Gerüst- und/oder Matrixbausteinen, insbesondere Wachstums-  
faktoren und/oder Cytokinen.

Durch die Verwendung von gewonnenen Knorpelzellen als  
30 Quelle von regenerationsfördernden Wachstumsfaktoren und  
bereits vorgeformter hyaliner Knorpelmatrix kann eine be-  
deutend schnellere Heilung von Knorpeldefekten erreicht  
werden als dies mit bisher bekannten Methoden möglich ist.

Ein wesentlicher Vorteil, den die Verwendung - *in vivo* oder *in vitro* - neben der schnellen Wirksamkeit bietet, ist die Tatsache, dass der Patient rein autolog behandelt werden kann und so das Risiko einer Abwehrreaktion auf das eingebrachte Transplantat ausgeschlossen werden kann.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Verwendung *in vivo* oder *in vitro*.

10 In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verwendung zur Behandlung einer Gewebeläsion, bevorzugt einer Knorpel-, Knochen- und/oder Muskelläsion.

Unter einer Läsion im Sinne der Erfindung sind alle  
15 Erkrankungen, Degenerationen oder Schädigungen von Zellen oder Gewebestrukturen zu verstehen. So können die erfindungsgemäßen Strukturen zur Behandlung von folgenden Erkrankungen, Degenerationen oder Schädigungen bevorzugt eingesetzt werden:

- 20 - Herzmuskelgewebeschädigungen,
- Arthrose (zum Beispiel Aufbringen Sphäroide auf Knorpeloberfläche und Abdeckung mit einer Membran),
- Rheuma, Arthritis,
- Erkrankungen aufgrund von Gendefekten oder
- 25 Genveränderungen,
- Infarkte (intravitale Gewebsnekrosen zum Beispiel Milzinfarkt),
- Ischämien (zum Beispiel aufgrund von Arterienverschluss),
- 30 - Fehlbildungen, Läsionen und Degeneration von Organen/Geweben des Nervensystems und des neuromuskulären Systems,

- Erkrankungen und Degeneration der Gewebe im Auge (zum Beispiel Hornhaut, Bindehaut), zum Beispiel Netzhautablösung,
- Erkrankungen und Degeneration des neuroendokrinen Systems (zum Beispiel Hypothyreosen der Schilddrüse),
- Kardiovaskuläres System (zum Beispiel Fehlbildungen am Herzen, Herzinfarkt),
- Respirationstraktschädigungen,
- Verdauungstrakt (Ösophagitis, zum Beispiel Magenschleimhautaufbau nach Gastritiden),
- Knochen: nicht-heilende Frakturen, Knochenaufbau nach Tumoren,
- Gelenke: Meniskuserkrankungen und Schädigungen, Bandscheiben, Sehnen, Bänder und
- Hautschädigungen (zum Beispiel Hypotrichosen).

Aus der Offenbarung der erfindungsgemäßen Verwendung kann der Fachmann jedoch weitere äquivalente Verwendungen selbst ableiten. Die erfindungsgemäße Gewebeersatzstruktur, also das Kombinationspräparat aus vorgeformtem dreidimensionalem Gewebe und dem jeweiligen Zusatz, das heißt der Gewebezellsuspension, dem Implantat oder Trägermaterial oder den Wachstumsfaktoren, kann für alle Gewebe angewandt werden, aus denen Zellen isoliert und einzeln oder für die Herstellung des vorgeformten dreidimensionalen Gewebes verwendet werden können. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass als Zusatz für das vorgeformte dreidimensionale Gewebe im Sinne der Erfindung physikalische Kräfte, wie elektromagnetische Felder, mechanische Stimulierung und/oder Ultraschall angewendet werden können. In einem solchen Falle wird das vorgeformte dreidimensionale Gewebe *in vitro* oder *in vivo* mit den genannten physikalischen Kräften so in Kontakt gebracht, dass eine Heilung der Läsion oder des Defektes erfolgt.



Weiterhin können die erfindungsgemäßen Gewebeersatzstrukturen auch als Organersatz verwendet werden, beispielsweise für die Wiederherstellung einer oder mehrerer Organfunktionen der oben genannten Gewebe. Weitere bevorzugte Organe oder Gewebe sind. Dopamin-produzierende Strukturen und Gewebe bei der Behandlung von Parkinson oder Nervendegenerationserkrankungen, Insulin-produzierende Strukturen bei der Behandlung von Bauchspeicheldrüsendefekten, Thyroxin-produzierende Gewebe bei der Behandlung von Schilddrüsendefekten, aber auch Liberine- oder Statine-produzierende Ersatzstrukturen zur Wiederherstellung der Hypothalamusfunktion.

Die Erfindung betrifft auch eine Gewebeersatzstruktur ausgewählt aus der Gruppe umfassend Muskel-, Binde-, Haut-, Fett-, Nerven-, Lebergewebe, Endothelien, Epithelien und/oder Stammzellen, die dadurch herstellbar ist, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Zellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden, bis ein Zellaggregat entsteht, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind.

Die Erfindung betrifft auch einen Kit, der die erfindungsgemäßen Strukturen umfasst und dessen Verwendung in der Diagnose und Therapie. Der Kit kann zusätzlich Puffer, Seren, Salze, Kulturmedien sowie Informationen zum Kombinieren dieser Inhalte umfassen.

Die Erfindung betrifft also eine Gewebeersatzstruktur und ein Verfahren zur Modifikation bzw. Behandlung von Gewebeläsionen, beispielsweise von Knorpelläsionen, mit ausschließlich körpereigenem dreidimensionalem gezüchteten

Knorpel in Form so genannter Sphäroide; hiermit ist beispielsweise die Wiederherstellung von degeneriertem Arthroseknorpel möglich. Mit Hilfe dieser Sphäroidtechnologie bzw. der Sphäroide wird eine Plattform-  
5 technologie für weitreichende weitere Produktinnovationen bereitgestellt, womit die körpereigene Zellregeneration von traumatisch bedingten Gelenk-Knorpelschäden möglich ist. Dieser Einsatz von patienteneigenen, durch Sphäroide produzierten Wachstumsfaktoren führt zu einer wesentlich  
10 schnelleren Ausbildung von druckstabilem Gelenkknorpel. Erreicht wird dies insbesondere durch gezieltes monospezifisches Heranwachsen von Knorpel, wodurch eine minimal invasive, arthroskopische autologe Chondrozytentransplantationsbehandlung möglich ist. Insbesondere werden hier-  
15 durch die Krankenhaus- und Rehabilitationszeiten signifikant vermindert. Ebenfalls vermindert werden die Kosten und es wird eine schnellere Wiederherstellung des behandelten Patienten erreicht. Diese Sphäroidtechnologie ist selbstverständlich nicht auf Knorpel<sup>7</sup> beschränkt, sondern  
20 kann zur Regeneration von allen menschlichen Geweben eingesetzt werden.

Im Folgenden soll die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert werden, ohne auf diese beschränkt zu sein.

### Ausführungsbeispiele

25

#### Herstellung der ersten Komponente (Knorpel) des Kombinationspräparates (Gewebeersatzstruktur)

30

Vom Patienten wird aus einem Bereich hyalinen, gesunden Knorpels eine Biopsie entnommen. Aus dieser Biopsie werden mittels enzymatischen Verdaus durch Inkubation mit Kollagenaselösung die Chondrozyten isoliert. Nach Trennung der isolierten Zellen vom unverdauten Knorpelgewebe werden diese in Zellkulturflaschen überführt und unter Zugabe von

DMEM/Hams F12 Kulturmedium (1/1) und 10 % autologem Serum des Patienten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zweimal wöchentlich wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wird die Zellschicht mit  
5 physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mittels Trypsin von der Zellkulturoberfläche geerntet. Nach einer weiteren Waschung werden  $1 \times 10^5$  Zellen in je ein Zellkulturgefäß überführt, das mit Agarose beschichtet ist. Nach einem Tag haben sich die ersten Zellen in Aggregaten  
10 angeordnet. Diese Aggregate werden alle 2 Tage mit frischem Medium versorgt und für mindestens 2 Wochen kultiviert.

Bereits nach einer Woche wurden Kollagen Typ II und Proteoglycane in den Aggregaten nachgewiesen. Dazu wurde ein  
15 spezifischer Antikörper gegen Kollagen Typ II verwendet. Der an Kollagen Typ II gebundene Primärantikörper wurde mit Hilfe eines Zweitantikörpers und daran gekoppeltem ABC-System nachgewiesen. Das heißt, an dem 2. Antikörper ist über Avidin- Biotin das Enzym Alkalische Phosphatase  
20 gekoppelt, welches das Substrat Fuchsin umsetzt, wobei ein roter Farbstoff entsteht.

Die Proteoglycane wurden mittels Goldnerfärbung nachgewiesen. Kollagen Typ II und Proteoglycane sind Bestandteile  
25 der Knorpelmatrix *in vivo* und stellen die wichtigsten Strukturproteine dar, die für die Funktion des Knorpels von entscheidender Bedeutung sind.

In der äußeren Schicht der Aggregate wurde zum gleichen  
30 Zeitpunkt das für Knorpelzellen spezifische Protein S 100 nachgewiesen. S 100 wird nicht in Knochengewebe und Bindegewebe exprimiert. Nur diese Gewebe könnten hierbei auch entstehen. Somit wurde eindeutig nachgewiesen, dass das entwickelte Gewebe Knorpelgewebe ist.

Nach 1 bis 2 Wochen Kultivierung liegen die Zellen noch dicht beieinander. Mit steigender Kultivierungsdauer nimmt der Anteil an extrazellulärer Matrix zu und der Anteil an Zellen ab. Nach einer Woche ist mindestens 40 % ECM nachweisbar und nach 3 Wochen wurde bereits zirka 60 % ECM entwickelt. Nach 3 Monaten Kultivierung der Knorpelgewebe ist der Anteil an ECM auf 80 bis 90 % angestiegen. Das heißt, im Inneren der hergestellten Aggregate wurde knorpelartiges Gewebe aufgebaut, welches im Aufbau dem *in vivo* Knorpel entspricht und auch die Funktion von Knorpelgewebe übernehmen kann.

#### Herstellung einer weiteren ersten Komponente (Knochengewebe)

Vom Patienten wird eine Knochenbiopsie aus dem Bereich des Spongiosaknochens entnommen. Aus dieser Biopsie werden mittels enzymatischen Verdaus durch Inkubation mit Kollagenaselösung die Osteoblasten isoliert. Nach Trennung der isolierten Zellen vom unverdauten Knochengewebe werden diese in Zellkulturflaschen überführt und unter Zugabe von DMEM/Hams F12 Kulturmedium (1/1) und 10 % autologem Serum des Patienten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zweimal wöchentlich wird ein Mediumwechsel vorgenommen. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wird die Zelllayer mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mittels Trypsin von der Zellkulturoberfläche geerntet. Nach einer weiteren Waschung werden  $1 \times 10^5$  Zellen in je ein Zellkulturgefäß überführt, das mit Agarose beschichtet ist. Nach einem Tag haben sich die ersten Zellen in Aggregaten angeordnet. Diese Aggregate werden alle 2 Tage mit frischem Medium versorgt und für mindestens 2 Wochen kultiviert.

Bereits nach einer Woche wurden Kollagen Typ I und Proteoglycane in den Aggregaten nachgewiesen. Dazu wurde ein

spezifischer Antikörper gegen Kollagen Typ I verwendet. Durch den Nachweis von Kollagen I wurde zweifelsfrei nachgewiesen, dass es sich nicht um Knorpelgewebe handelt. Der an Kollagen Typ I gebundene Primärantikörper wurde mit Hilfe eines Zweitantikörpers und daran gekoppeltem ABC-System nachgewiesen. Das heißt, an dem 2. Antikörper ist über Avidin- Biotin das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt, welches das Substrat Fuchsin umsetzt, wobei ein roter Farbstoff entsteht.

Die Proteoglycane wurden wie in Beispiel 1 mittels Goldnerfärbung nachgewiesen. Kollagen Typ I und Proteoglykane sind Bestandteile der Knochenmatrix *in vivo* und stellen die wichtigsten Strukturproteine dar, die für die Funktion des Knochens von entscheidender Bedeutung sind.

In der äußeren Schicht der Aggregate wurden zum gleichen Zeitpunkt proliferationsfähige Knochenzellen nachgewiesen.

Nach 2 Wochen Kultivierung liegen die Zellen noch dicht beieinander. Mit steigender Kultivierungsdauer nimmt der Anteil an extrazellulärer Matrix zu und der Anteil an Zellen ab. Nach einer Woche ist mindestens 40 % ECM nachweisbar und nach 3 Wochen wurde bereits zirka 60% ECM entwickelt. Das heißt, im Inneren der hergestellten Aggregate wurde knochenartiges Gewebe aufgebaut, welches in der Zusammensetzung dem *in vivo* Knochen entspricht und auch die Funktion von Knochengewebe übernehmen kann.

Die so gewonnenen Einzelkomponenten können nun mit Knorpelsuspensionszellen/Einzellzellen kombiniert werden. Hierbei dienen die in den dreidimensionalen *in vitro* Geweben durch die Zellen hergestellten und sezernierten Wachstumsfaktoren der Förderung der Denovoregeneration des Gelenkknorpels bzw. der Knochenstruktur und damit der Steigerung der Wirk-

samkeit bei der Behandlung von Knorpel- oder Knochengeweben.

5 Kombination aus vorgeformten dreidimensionalen Gewebe (Sphäroiden) aus Knochenzellen mit elektromagnetischen Feldern

10 Während der Herstellung der Knochenzell-basierten Sphäroide und/oder nach dem Einbringen der Knochensphäroide in ein erkranktes, degeneriertes oder zerstörtes Gewebe, die Gewebe bzw. die Gewebe regenerierenden Prozesse wird *in vivo* mittels elektromagnetischen Feldern stimuliert. Erstaunlicherweise wurde festgestellt, dass bei Applikation eines elektromagnetischen Feldes mit einer Trägerfrequenz  
15 von 5 KHz und unterschiedlichen Modulationsfrequenzen (zum Beispiel 16 Hz) die Reifung der Sphäroide hergestellt aus Knochenzellen stimuliert ist. Weiterhin ist es möglich, die Sphäroide mit Wachstumsfaktoren zu kombinieren. Es wurde überraschenderweise festgestellt, dass nach Zugabe von exo-  
20 genen Wachstumsfaktoren während der Herstellung der Sphäroide aus Knorpelzellen das Wachstum der Knorpelzellen, aber auch die Matrixbildung und -reifung positiv beeinflusst werden kann.

25 Herstellung von Sphäroiden aus gentechnisch manipulierten Knorpelzellen in Kombination mit Knorpelzellen in Suspension

30 Es wurde gezeigt, dass man Infektionen von humanen Knorpelzellen und Herstellung aus diesen von Sphäroiden die Reifung des gebildeten Knorpelgewebes gefördert wird. Dies bedeutet insbesondere für die klinische Anwendung eine Beschleunigung der Defekteheilung bzw. der Gewebe der Regeneration.

### Kombinationen aus Sphäroiden mit PLA/PGA Polymeren

Die Sphäroide, die aus Knochenzellen hergestellt wurden, werden für die Beschichtung oder für das Einwachsen im Trägermaterial verwendet, wie zum Beispiel neutral abbaubende PLA/PGA Polymere und Kollagenfleece, welche als Gerüstsubstanzen im Tissue Engineering implantiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass nach Zugabe von Sphäroiden, hergestellt aus Knochenzellen auf der Oberfläche von neutral abbauenden PLA/PGA Polymeren, diese die Oberfläche bewachsen und eine Abschlussschicht bilden, aber auch ins Innere der Polymere einwandern. Für die klinische Anwendung wird dadurch eine schnellere Defektheilung und ein schnellerer Umbau des neutral abbaubaren PLA/PGA Polymers erreicht. Gleiches konnte für die Kombination von Sphäroiden aus Knochenzellen mit Kollagenmembran gezeigt werden.

### Miniskus

Vorgeformtes dreidimensionales Miniskusknorpelgewebe wird wie für Knorpelgewebe beschrieben hergestellt und außerhalb des Körpers, zum Beispiel während der Operation, mit einem Trägermaterial kombiniert, welches die mechanische Stabilität und Form vorgibt.

### Muskel

Dreidimensionale Muskelzellen werden analog der Herstellung der Knorpelzellen hergestellt und mit einer autologen Muskelzellsuspension kombiniert, wobei diese aus körpereigenen Herzmuskelzellen oder Stammzellen besteht und weiterhin körpereigenes Serum, aber ohne den Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen, umfasst. Anstelle der autologen Muskelzellsuspension aus körpereigenen Herzzellen und/oder Stammzellen kann das dreidimensionale vorgeformte

Gewebe auch auf eine Membran aufgebracht werden, um dann in den Muskeldefekt ein- bzw. aufgebracht zu werden.

### Bindegewebszellen

5

Ein weiteres Beispiel betrifft die Herstellung von Sphroiden aus Bindegewebszellen, die gentechnisch dahingehend modifiziert werden, dass sie einen Vektor für die Insulinsynthese enthalten. Die aus diesen Zellen  
10 hergestellten Spheroide werden in ein inertes Trägermaterial eingekapselt, durch welches die Diffusion von Insulin nach außen ermöglicht wird. Diese Kombination wird implantiert in die blutzuführende Arterie. Durch diese Vorgehensweise wird aufgrund der hohen Zellkonzentration in  
15 den Sphroiden eine besonders hohe Insulinausschüttung ermöglicht, wodurch die therapeutische Wirkung erhöht wird.



### Patentansprüche

- 5 1. Gewebeersatzstruktur,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass sie
- (a) ein vorgeformtes dreidimensionales Gewebe herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Zellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden, bis ein Zellaggregat entsteht, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind,
- (b) (i) eine autologe Gewebezellsuspension herstellbar aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen, (ii) Implantate oder Trägermaterialien und/oder (iii) Wachstumsfaktoren und/oder
- (c) die Einwirkung von elektromagnetischen Feldern, mechanischer Stimulierung und/oder Ultraschall auf das Gewebe nach (a)
- umfasst.
- 30 2. Gewebeersatzstruktur nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass

die Gewebeersatzstruktur eine Knorpelersatzstruktur ist, wobei die Gewebezell suspension eine Knorpelzellsuspension ist, das dreidimensionale Gewebe ein Knorpelgewebe ist, aus dem Organismus Knorpelzellen, Knochenzellen und/oder mesenchymale Stammzellen gewonnen werden und das Zellaggregat mindestens 40 Vol.% extrazelluläre Matrix beinhaltet.

3. Gewebeersatzstruktur nach Anspruch 1 oder 2,

**dadurch gekennzeichnet, dass**

sie eine Muskulatur-, Knochen-, Bindegewebs-, Haut-, Fett-, Nerven-, Leber-, Endothelien- und/oder Epitheliensersatzstruktur ist, insbesondere eine glatte Herzmuskulaturersatzstruktur.

4. Gewebeersatzstruktur ausgewählt aus der Gruppe umfassend Muskel-, Binde-, Haut-, Fett-, Nerven-, Lebergewebe, Endothelien, Epithelien und/oder Stammzellen,

**dadurch gekennzeichnet, dass**

es dadurch herstellbar ist, dass aus einem menschlichen oder tierischen Organismus Zellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden, bis ein Zellaggregat entsteht, in welchem differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind.

5. Verfahren zur Modifikation einer Gewebeläsion,

**dadurch gekennzeichnet, dass**

in die Gewebeläsion

(a) ein vorgeformtes dreidimensionales Gewebe herstellbar dadurch, dass aus einem menschlichen oder

tierischen Organismus Zellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden, bis ein Zellaggregat entsteht, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind

und

(b) eine autologe Zellsuspension herstellbar aus körpereigenen Zellen unter Zusatz von körpereigenem Serum und ohne Zusatz von wachstumsfördernden Verbindungen

einggebracht werden

und/oder

(c) mit elektromagnetischen Feldern, mechanischer Stimulierung und/oder Ultraschall auf das Gewebe nach (a) eingewirkt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Gewebeläsion eine Knochen-, Knorpel- und/oder Muskelläsion ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass bei der Modifikation der Knorpelläsion als die Zellsuspension eine Knorpelzellsuspension als das dreidimensionale Gewebe ein Knorpelgewebe hergestellt wird, wobei aus dem Organismus Knorpelzellen, Knochenzellen und/oder mesenchymale Stammzellen gewonnen werden und

das Zellaggregat zu mindestens 40 Vol.% extrazelluläre Matrix beinhaltet.

8. Verfahren nach Anspruch 7,  
5     **dadurch gekennzeichnet**, dass  
nach Einbringen der Knorpelzellsuspension und des Knorpelgewebes die Läsion mit einer Membran abgedeckt wird.
- 10   9. Verwendung von aus einem menschlichen oder tierischen Organismus gewonnenen Knorpelzellen, Muskelzellen, Knochenzellen und/oder mesenchymale Stammzellen, die in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Oberfläche und sich  
15     verjüngendem Boden als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert werden, bis ein Zellaggregat entsteht, in welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das einen äußeren Bereich aufweist, in welchem proli-  
20     ferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind, als Lieferant von intrazellulären Botenstoffen, Struktur-, Gerüst- und/oder Matrixbausteinen.
10. Verwendung nach Anspruch 9,  
   **dadurch gekennzeichnet**, dass  
25     die intrazellulären Botenstoffe Wachstumsfaktoren und/oder Cytokinen sind.
11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10 *in vivo* oder *in vitro*.
- 30   12. Verwendung einer Gewebeersatzstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Behandlung einer Gewebeläsion.
13. Verwendung nach Anspruch 12,  
   **dadurch gekennzeichnet**, dass

die Gewebeläsion eine Knorpel-, Knochen- und/oder Muskelläsion ist.

- 5 14. Verwendung einer Gewebeersatzstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 4 als *in vitro* oder *in vivo* Testsystem, insbesondere zum Screening von Wirkstoffen.
- 10 15. Kit umfassend mindestens eine Gewebeersatzstruktur nach einem der Ansprüche 1 bis 4, gegebenenfalls zusammen mit einer Information zum Kombinieren der Inhalte des Kits.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N5/06 A61K35/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 68811 A (FRITSCH KARL GERD ;CO DON AG (DE); ANDERER URSULA (DE); LIBERA JEA) 20 September 2001 (2001-09-20)	1-4, 9-15
Y	the whole document	5-8
X	ANDERER URSULA ET AL: "In vitro engineering of human autogenous cartilage." JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, vol. 17, no. 8, August 2002 (2002-08), pages 1420-1429, XP009026956 ISSN: 0884-0431 (ISSN print)	4, 9-15
Y	the whole document	1-3, 5-8
X	US 5 723 331 A (TUBO ROSS A ET AL) 3 March 1998 (1998-03-03)	4, 9-15
Y	the whole document	1-3, 5-8
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the International filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

5 March 2004

Date of mailing of the international search report

16/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Morawetz, R

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 22747 A (GEN HOSPITAL CORP) 14 May 1999 (1999-05-14) the whole document ---	1-15
Y	OCHI MITSUO ET AL: "Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect" ARTIFICIAL ORGANS, vol. 25, no. 3, March 2001 (2001-03), pages 172-179, XP002272583 ISSN: 0160-564X the whole document ---	1-15
Y	WO 02 10351 A (SITTINGER MICHAEL ;WANJURA FRANK (DE); GROEGER ANDREAS (DE); HAISC) 7 February 2002 (2002-02-07) the whole document ---	1-3,5-8, 12-15
Y	NISHIKORI T ET AL: "Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen(R) gel" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, vol. 59, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 201-206, XP002272584 ISSN: 0021-9304 the whole document ---	1-3,5-8, 12-15
Y	MEYER U ET AL: "Mechanical tension in distraction osteogenesis regulates chondrocytic differentiation." INTERNATIONAL JOURNAL OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY. DENMARK DEC 2001, vol. 30, no. 6, December 2001 (2001-12), pages 522-530, XP009027141 ISSN: 0901-5027 the whole document ---	1-3,5-8, 12-15
Y	BRITTBERG M ET AL: "Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update." CLINICAL ORTHOPAEDICS AND RELATED RESEARCH, (2001 OCT) (391 SUPPL) S337-48. REF: 39 , XP009027036 the whole document ---	1-3,5-8, 12-15
	--- -/--	

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BRITTBERG M ET AL: "TREATMENT OF DEEP CARTILAGE DEFECTS IN THE KNEE WITH AUTOLOGOUS CHONDROCYTE TRANSPLANTATION" NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, WALTHAM, MA, US, vol. 331, no. 14, 1994, pages 889-895, XP001015827 ISSN: 0028-4793 the whole document	
P,Y	WIESMANN H P ET AL: "Extracorporeal biophysical stimulation of osteoblast cultures for bone tissue engineering." TISSUE ENGINEERING, vol. 9, no. 4, August 2003 (2003-08), pages 796-797, XP009026955 Second Meeting of the European Tissue Engineering Society; Genoa, Italy; September 03-06, 2003 ISSN: 1076-3279 (ISSN print) the whole document	1-3, 5-8, 12-15



**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although claims 5-14 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.
2. ☒ Claims Nos.: 1, 3, 4, 5, 12, 14 and 15 (all in part)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Continuation of I.2

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The current claims 1, 3, 4, 5, 12, 14 and 15 relate to a product, or its use, characterized by a desirable characteristic or property, that is being producible by extracting cells from a human or animal organism and cultivating these long enough to form a cell aggregate.

The claims therefore encompass all products, or uses thereof, that have this characteristic or property, but the application provides support by the description (PCT Article 5) for only a limited number of such products, etc. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Moreover, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the product in terms of the desired result. This lack of clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire scope of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appear to be clear, supported or disclosed in the above sense, that is the parts concerning cartilage or bone replacement structures as indicated in the examples.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0168811	A	20-09-2001	DE 10013223 A1	11-10-2001
			AU 3928701 A	24-09-2001
			CA 2403120 A1	13-09-2002
			WO 0168811 A2	20-09-2001
			EP 1265986 A2	18-12-2002
			US 2003153078 A1	14-08-2003
US 5723331	A	03-03-1998	AU 2435495 A	29-11-1995
			AU 2468995 A	29-11-1995
			WO 9530383 A1	16-11-1995
			WO 9530742 A1	16-11-1995
			US 5786217 A	28-07-1998
WO 9922747	A	14-05-1999	CA 2307743 A1	14-05-1999
			EP 1030676 A1	30-08-2000
			JP 2001521786 T	13-11-2001
			WO 9922747 A1	14-05-1999
			US 6183737 B1	06-02-2001
			US 2003099620 A1	29-05-2003
			US 2001006634 A1	05-07-2001
WO 0210351	A	07-02-2002	DE 10038700 A1	21-02-2002
			WO 0210351 A2	07-02-2002
			EP 1307543 A2	07-05-2003

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N5/06 A61K35/32

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01 68811 A (FRITSCH KARL GERD ;CO DON AG (DE); ANDERER URSULA (DE); LIBERA JEA) 20. September 2001 (2001-09-20)	1-4,9-15
Y	das ganze Dokument	5-8
X	ANDERER URSULA ET AL: "In vitro engineering of human autogenous cartilage." JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, Bd. 17, Nr. 8, August 2002 (2002-08), Seiten 1420-1429, XP009026956 ISSN: 0884-0431 (ISSN print)	4,9-15
Y	das ganze Dokument	1-3,5-8
X	US 5 723 331 A (TUBO ROSS A ET AL) 3. März 1998 (1998-03-03)	4,9-15
Y	das ganze Dokument	1-3,5-8
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. März 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/03/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Morawetz, R

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 99 22747 A (GEN HOSPITAL CORP) 14. Mai 1999 (1999-05-14) das ganze Dokument	1-15
Y	OCHI MITSUO ET AL: "Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect" ARTIFICIAL ORGANS, Bd. 25, Nr. 3, März 2001 (2001-03), Seiten 172-179, XP002272583 ISSN: 0160-564X das ganze Dokument	1-15
Y	WO 02 10351 A (SITTINGER MICHAEL ;WANJURA FRANK (DE); GROEGER ANDREAS (DE); HAISC) 7. Februar 2002 (2002-02-07) das ganze Dokument	1-3,5-8, 12-15
Y	NISHIKORI T ET AL: "Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen(R) gel" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, Bd. 59, Nr. 2, Februar 2002 (2002-02), Seiten 201-206, XP002272584 ISSN: 0021-9304 das ganze Dokument	1-3,5-8, 12-15
Y	MEYER U ET AL: "Mechanical tension in distraction osteogenesis regulates chondrocytic differentiation." INTERNATIONAL JOURNAL OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY. DENMARK DEC 2001, Bd. 30, Nr. 6, Dezember 2001 (2001-12), Seiten 522-530, XP009027141 ISSN: 0901-5027 das ganze Dokument	1-3,5-8, 12-15
Y	BRITTBERG M ET AL: "Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update." CLINICAL ORTHOPAEDICS AND RELATED RESEARCH, (2001 OCT) (391 SUPPL) S337-48. REF: 39 , XP009027036 das ganze Dokument	1-3,5-8, 12-15

-/--

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BRITTBERG M ET AL: "TREATMENT OF DEEP            CARTILAGE DEFECTS IN THE KNEE WITH            AUTOLOGOUS CHONDROCYTE TRANSPLANTATION"            NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE,            MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, WALTHAM,            MA, US,            Bd. 331, Nr. 14, 1994, Seiten 889-895,            XP001015827            ISSN: 0028-4793            das ganze Dokument</p> <p>----</p>	
P,Y	<p>WIESMANN H P ET AL: "Extracorporal            biophysical stimulation of osteoblast            cultures for bone tissue engineering."            TISSUE ENGINEERING,            Bd. 9, Nr. 4, August 2003 (2003-08),            Seiten 796-797, XP009026955            Second Meeting of the European Tissue            Engineering Society; Genoa, Italy;            September 03-06, 2003            ISSN: 1076-3279 (ISSN print)            das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	<p>1-3,5-8,            12-15</p>

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
Obwohl die Ansprüche 5-14 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☒ Ansprüche Nr. 1, 3, 4, 5, 12, 14 und 15 (alle teilweise)  
weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1, 3, 4, 5, 12, 14 und 15 (alle teilweise)

Die geltenden Patentansprüche 1, 3, 4, 5, 12, 14 und 15 beziehen sich auf ein Produkt, bzw. dessen Verwendung, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich herstellbar zu sein dadurch dass aus einem menschlichen oder tierischen Organsimus Zellen gewonnen werden und diese so lange kultiviert werden bis ein Zellaggregat entsteht.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte bzw. deren Verwendungen, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine sehr begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend Knorpel- bzw. Knochenersatzstrukturen wie in den Ausführungsbeispielen angegeben.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.



Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0168811	A	20-09-2001	DE 10013223 A1	11-10-2001
			AU 3928701 A	24-09-2001
			CA 2403120 A1	13-09-2002
			WO 0168811 A2	20-09-2001
			EP 1265986 A2	18-12-2002
			US 2003153078 A1	14-08-2003
US 5723331	A	03-03-1998	AU 2435495 A	29-11-1995
			AU 2468995 A	29-11-1995
			WO 9530383 A1	16-11-1995
			WO 9530742 A1	16-11-1995
			US 5786217 A	28-07-1998
WO 9922747	A	14-05-1999	CA 2307743 A1	14-05-1999
			EP 1030676 A1	30-08-2000
			JP 2001521786 T	13-11-2001
			WO 9922747 A1	14-05-1999
			US 6183737 B1	06-02-2001
			US 2003099620 A1	29-05-2003
			US 2001006634 A1	05-07-2001
WO 0210351	A	07-02-2002	DE 10038700 A1	21-02-2002
			WO 0210351 A2	07-02-2002
			EP 1307543 A2	07-05-2003